LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

MÉMOIRES ORIGINAUX :

A. PORTMANN. — Observations sur la numération des microorganismes lipolytiques du beurre selon la technique de Rath. 593

N. PINO et L. CHIOFALO. — Recherches sur la conductibilité électrique du lait de chèvre 603

J. CLAVEAU. — Une technique de préparation, d'expédition et d'utilisation de cultures pures destinées aux industries alimentaires utilisant des levains de microorganismes aérobies. 612

REVUE :

G. GÉNIN. — Le lait dans le monde 622

BIBLIOGRAPHIE ANALYTIQUE :

1^o Les livres 632

2^o Journaux, Revues, Sociétés savantes 641

3^o Brevets 674

BULLETIN BIBLIOGRAPHIQUE :

1^o Les livres 680

2^o Journaux, Revues, Sociétés savantes 681

3^o Brevets 687

DOCUMENTS ET INFORMATIONS :

Y. GANDON. — La situation laitière 690

Le cheptel français 693

L'industrie fromagère française 696

La production beurrière française 697

Le ramassage du lait et son prix de revient 697

Guide national de l'agriculture française 699

Table des matières. 700

Table des auteurs 704

Table des ouvrages analysés. 719

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

OBSERVATIONS SUR LA NUMÉRATION DES MICROORGANISMES « LIPOLYTIQUES DU BEURRE » SELON LA TECHNIQUE DE RATH

par A. PORTMANN

avec la collaboration technique de P. VEDRENNE

Laboratoire de Technologie Laitière I.N.R.A., Surgères (Charente-Maritime)

A l'occasion d'une enquête sur la qualité bactériologique du beurre, nous avons eu recours à la technique de RATH [1] pour la

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

numération des microorganismes lipolytiques. On sait que cette technique consiste à couler, — sur des colonies que trois jours d'incubation à 30° C en milieu gélosé ont déjà amenées à leur plein développement —, un beurre coloré par le bleu Victoria basique. On prolonge encore l'incubation pendant trois jours à 25° C et on dénombre finalement les colonies qui ont provoqué le virage au bleu de la couche de beurre.

Nous avons effectué des numérations selon cette technique sur plus de 150 échantillons de beurre et nous avons fait l'observation suivante : le résultat (nombre de lipolytiques/ml de beurre) diffère en général, selon la boîte de Petri choisie dans la série des dilutions pour dénombrer les colonies. Le plus souvent le nombre de colonies lipolytiques observé sur le milieu de RATH dans deux dilutions décimales successives donne, après multiplication par les facteurs de dilution respectifs, un chiffre nettement plus élevé lorsqu'on fait le calcul d'après le nombre de colonies développées sur la boîte de Petri dans laquelle le beurre à analyser est le plus dilué.

Dans le présent travail, on a recherché la cause des différences ainsi observées.

MÉTHODES

Nous avons dénombré systématiquement, par la méthode des dilutions décimales en milieu gélosé, les contaminants totaux sur milieu de MOGENSEN (M) et les lipolytiques selon la technique de RATH (TR).

RÉSULTATS

1. Confirmation des premières observations.

Les résultats indiqués dans le tableau I apportent, pour une dizaine d'échantillons de beurre, la confirmation qu'en partant du nombre de colonies lipolytiques (de 70 à 10 colonies) développées sur les boîtes de Petri correspondant aux dilutions dont le numéro d'ordre, sur le tableau, est le plus petit, on obtient, par calcul, un nombre (N) de germes lipolytiques par ml de sérum de beurre nettement inférieur à celui (N') calculé pour la dilution suivante (numéro de dilution le plus grand). On remarque d'autre part que, pour cette dernière dilution, le nombre de colonies par boîte va de 5 à 27, c'est-à-dire qu'il reste toujours inférieur au minimum de 30 colonies considéré comme nécessaire dans les techniques de numération pour l'obtention d'un résultat reproductible.

TABLEAU I

**INFLUENCE DU NUMÉRO DE LA DILUTION DÉCIMALE
SUR LE RÉSULTAT DU DÉNOMBREMENT
DES MICROORGANISMES LIPOLYTIQUES DANS LE BEURRE**

Numéro des échan- tillons	Examen bactériologique du beurre sur milieu de :					
	Numéro d'ordre de la dilution décimale	MOGENSEN	RATH		b/a × 100	
		Nombre (en milliers de germes) des con- taminants totaux calculé par ml de sérum de beurre : (a)	Nombre de colonies lipo- lytiques déve- loppées sur chacune des boîtes de Petri	Nombre de lipolytiques (en milliers de germes) calculé par ml de sérum de beurre : (b)		
				N (1)		N' (2)
1	4	8 700	23	230		2,6
	5		13		1 300	15
2	4	3 900	47	470		12
	5		9		900	23
3	2	57	70	7		12
	3		27		27	47
4	2	150	25	2,5		1,7
	3		16		16	10
5	2	46	55	5,5		12
	3		22		22	48
6	2	15	24	2,4		15
	3		12		12	77
7	2	29	10	1		3,4
	3		6		6	20
8	2	44	10	1		2,2
	3		5		5	11
9	2	40	35	3,5		8,7
	3		8		8	20
10	2	62	12	1,2		1,9
	3		11		11	18
12	4	2 460	27	270		11
	5		7		700	28
13	1	4,5	45	0,45		10
	2		23		2,3	52
Valeur moyenne de N ...				83		
Valeur moyenne de N' ...					250	

(1) N : Nombre de lipolytiques calculé d'après la dilution la plus faible.

(2) N' : Nombre de lipolytiques calculé d'après la dilution suivante.

La valeur moyenne de N est trois fois plus petite que la valeur moyenne de N' , mais les valeurs extrêmes de N et N' sont encore beaucoup plus éloignées.

2. Comparaison entre la numération des lipolytiques selon la technique de Rath et la numération selon une méthode de « référence ».

Nous avons alors effectué l'essai suivant :

Chacune des colonies développées sur l'une des boîtes M (ayant servi à la numération des contaminants totaux) a été repiquée ; la culture pure ainsi obtenue a été ensemencée sur TR . Après incubation on a examiné la culture afin de voir si elle était lipolytique ou non.

On a calculé ensuite la proportion de lipolytiques parmi toutes les cultures ainsi obtenues à partir de l'ensemble des colonies de contaminants développées sur une boîte de milieu M .

Cette méthode, qui est évidemment longue et très lourde, ne saurait être utilisée pour un travail de routine ; mais elle offre l'avantage de constituer une méthode de référence, puisque toutes les colonies de microorganismes contaminants sont examinées quant à leurs propriétés lipolytiques.

Les résultats sont indiqués dans le tableau II. On voit que le nombre (N'') de lipolytiques par ml de sérum de beurre est nettement plus élevé que N et est, en moyenne, du même ordre que N' ; mais si l'on considère chacun des échantillons isolément, on voit qu'en réalité, pour certains échantillons, de grandes différences existent entre N'' et N' .

C'est ainsi que pour l'échantillon numéro 4, le nombre N est de 2 500 par ml, le nombre N' de 16 000 par ml et le nombre N'' de 36 000 par ml.

Sur la figure 1, on a effectué un classement des échantillons d'après leur teneur en lipolytiques. On voit qu'il existe des différences notables entre les valeurs relatives des nombres N et N' d'une part, celles des nombres N et N'' d'autre part.

Cette série d'essais montre donc :

a) Qu'avec la technique de RATH, comportant l'ensemencement direct du beurre, la dilution qui donne naissance à quelques colonies seulement sur la gélose avec graisse donne un « ordre de grandeur » approché du nombre de lipolytiques, mais ne permet pas de calculer un nombre précis, ni de classer correctement les échantillons les uns par rapport aux autres.

TABLEAU II

**PROPORTION DE LIPOLYTIQUES PARMI LES COLONIES
PRÉLEVÉES SUR LE MILIEU DE MOGENSEN
ET REPIQUÉES SUR LE MILIEU DE RATH**

Numéro des échantillons	Colonies prélevées sur le milieu de Mogensen et repiquées sur le milieu de Rath			Nombre (en milliers de germes) de lipolytiques calculé par ml de sérum de beurre N''
	Nombre total de colonies repiquées (c)	Nombre total de colonies lipolytiques (d)	$\frac{d}{c} \times 100$	
1	82	5	6	522
3	52	34	65	37
4	63	15	24	36
5	43	13	29	13
7	31	3	10	3
8	42	7	16,5	7
9	37	5	13	5,4
10	66	9	13	8
12	35	11	31	762
13	45	14	31	1,4
Valeur moyenne de N''				139,5

b) Que la dilution qui la précède donne très souvent un nombre de lipolytiques *nettement trop faible* et comporte aussi des erreurs de classement.

3. Reproduction expérimentale des anomalies observées au cours de la numération des microorganismes lipolytiques du beurre.

Nous avons supposé que ces anomalies pouvaient provenir d'une action antagoniste s'exerçant entre les microorganismes apportés dans le milieu de culture gélosé, action qui serait d'autant plus marquée que le nombre de colonies dans la boîte de Petri serait lui-même plus grand.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons recherché parmi les souches microbiennes isolées du beurre la présence éventuelle de bactéries « inhibitrices », c'est-à-dire de bactéries empêchant la mise en évidence des lipolytiques sur le beurre coloré. Parmi les souches essayées quant à leurs propriétés inhibitrices, on a retenu seulement celles qui n'étaient pas elles-mêmes lipolytiques afin de

Fig. 1. — Classement des échantillons de beurre d'après leur teneur en lipolytiques : Nombre de lipolytiques calculé à partir des résultats obtenus avec la technique de Rath, (N) dilution la plus faible, (N') dilution suivante. Nombre de lipolytiques (N'') calculé à partir de la méthode de repiquage des colonies.

bien séparer les deux phénomènes : lipolyse d'une part, inhibition d'autre part. Les souches inhibitrices, de même que les souches lipolytiques, ont été cultivées sur bouillon pendant 24 h à 30° C ; chaque culture a ensuite été diluée dans du Ringer et 1 ml d'une dilution de culture lipolytique a été mélangé à 1 ml d'une dilution de culture inhibitrice. Aussitôt après, on a effectué la numération des lipolytiques selon TR, à la fois sur le mélange des deux souches et sur les souches pures servant de témoin.

On voit, sur le tableau III, que, parmi 9 souches lipolytiques, 3 microcoques (GV 9, 37 N, X1-B1) et 2 levures (14 L, 88-16) sont

TABLEAU III

INFLUENCE DE PLUSIEURS SOUCHES DE MICROORGANISMES
SUR LA NUMÉRATION DE LIPOLYTIQUES SELON LA TECHNIQUE DE RATH

Microorganismes : lipolytiques : inhibiteurs :									
	LG 61	GV 9	MF 3	LG 69	37 N	14 L	X1-B 1	88-16	HA 1
LG 3	+	—	+	+	—	—	—	+	+
31-9	+	+	+	+	+	+	+		
88-12	+	+	+	+	+	+	+		
Z 2	+	—	+	+	—	+		+	+
GV 15	+	+	+	+	+	+	+		
GV 23	+	+	+	+	+		+		
S C P	+	—	+	+	—	—	+	+	+
88 B1	+	+	+	+	+	+	+		
S 34	+	—	+	+		—		—	
SR	+	—	+	+	—	+		+	+
88 B2	+	+	+	+	—		—	—	
88-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TB 15	+	—	+	+	+	+	—	+	+

(+) Formation d'une zone bleue dans le milieu au beurre coloré.

(—) Pas de formation de zone bleue dans le milieu au beurre coloré.

sensibles, tandis que 4 autres, parmi lesquelles un *Corynebacterium* (LG 69), une levure (HA 1) et 2 souches non identifiées (MF 3 et LG 61), peuvent être considérées comme résistantes aux microorganismes « inhibiteurs » essayés.

Parmi 13 souches de contaminants, 7 sont inhibitrices, 2 *Escherichia* (LG 3, SCP), 2 *Achromobacter* (Z 2, SR), 2 *Flavobacterium* (S 34, TB 15) et un *Bacillus* (88 B2).

Nous avons ensuite, à partir de mélanges appropriés de souches « inhibitrices », « résistantes » et « sensibles », effectué la numération des lipolytiques selon TR.

Le tableau IV montre que, si le nombre de colonies formées par la souche « inhibitrice » est assez grand — compris par exemple entre 400 et 500 sur une même boîte de Pétri — les colonies lipolytiques « résistantes » sont les seules à être dénombrées, car elles forment une zone bleue dans TR. A la dilution suivante, le nombre de colonies « inhibitrices » étant inférieur à 50 par boîte de Petri, l'inhibition cesse et toutes les colonies lipolytiques, formées de bactéries « résistantes » ou de bactéries « sensibles », font virer au bleu le milieu TR.

Les observations ci-dessus ont été faites selon TR pour la numération des lipolytiques, mais nous avons également utilisé le milieu à la tributyrine (T.B.A.), dans lequel existe aussi (mais pas pour toutes les souches « sensibles » selon TR) un effet inhibiteur ; toutefois, le nombre de microorganismes « inhibiteurs » nécessaire pour empêcher l'activité lipolytique est de 5 à 10 fois plus élevé que dans le cas de la technique de RATH.

DISCUSSION

Si le phénomène qui faisait l'objet de notre étude a été reproduit expérimentalement, la recherche n'est pas encore suffisamment avancée pour expliquer le mécanisme grâce auquel certaines espèces microbiennes empêchent la mise en évidence de la lipolyse dans le milieu de RATH.

Quel que soit ce mécanisme, une conclusion s'impose : la technique de RATH ne permet pas, dans tous les cas, de dénombrer d'une façon sûre les lipolytiques du beurre ni d'effectuer un classement des échantillons en fonction de leur teneur en lipolytiques.

D'après nos observations, il semble que l'inhibition exercée par certains types de bactéries puisse être observée seulement si le nombre des bactéries par ml de milieu est assez grand. Or, le volume de milieu nutritif ajouté est de 2 ml avec la technique de RATH et de 10 ml avec la tributyrine. Par conséquent, l'inhibition qui se produit dans la technique de RATH lorsque les colonies inhibi-

TABLEAU IV

NUMÉRATION SUR MILIEU GÉLOSE EN BOÎTE DE PETRI,
POUR DEUX DILUTIONS DÉCIMALES SUCCESSIVES (A ET B),
DES MICROORGANISMES LIPOLYTIQUES, INOCULÉS SEULS OU EN MÉLANGE
AVEC DES BACTÉRIES « INHIBITRICES »

Microorganismes utilisés	Nombre de colonies comptées dans la boîte de Petri, après 3 jours d'incubation à 30° C		Nombre de colonies lipolytiques comptées dans les mêmes boîtes de Petri après étalement du beurre coloré, et incubation additionnelle de 3 jours à 25° C, selon Rath	
	Dilution A B		Dilution A B	
<i>Essai n° 1 :</i>				
« Inhibiteur » SCP (1)	450	45	0	0
« Sensible » GV 9 (1)	400	41	400	41
« Résistant » LG 61 (1)	77	6	77	6
Mélange SCP, GV 9 et LG 61 .	960	95	72	46
<i>Essai n° 2 :</i>				
« Inhibiteur » SCP (1)	380	4	0	0
« Sensible » GV 9 (1)	170	16	170	16
« Résistant » LG 61 (1)	12	1	12	1
Mélange SCP, GV 9 et LG 61 .	550	58	10	16
<i>Essai n° 3 :</i>				
« Inhibiteur » SCP (1)	415	28	0	0
« Sensible » GV 9 (1)	114	21	114	21
Mélange SCP et GV 9	550	52	6 (2)	14
<i>Essai n° 4 :</i>				
« Inhibiteur » SCP (1)	430	45	0	0
« Résistant » LG 61 (1)	75	7	75	7
Mélange SCP et LG 61	520	58	72	5

(1) Dans le cas des souches pures, la numération est effectuée sur un volume de culture égal à celui qui interviendra dans le mélange, soit 0,33 ml.

(2) Colonies extrêmement petites et virage au bleu du milieu à peine sensible.

trices exercent leur action dans 2 ml de milieu nutritif peut ne pas exister lorsque ces mêmes colonies se développent dans 10 ml de milieu à la tributyrine. Ceci pourrait expliquer pourquoi, dans certains cas, le nombre de lipolytiques trouvé sur le milieu à la tributyrine (T.B.A.) est plus élevé que sur le milieu de RATH, comme le signalent d'ailleurs BRANDL et al. [2].

Il reste à montrer dans quelle mesure le phénomène masquant l'activité lipolytique de certaines souches bactériennes correspond, ou non, à une véritable inhibition. S'il s'agit bien d'une inhibition, il serait alors important de savoir si elle joue, ou si elle ne joue pas, un rôle dans le beurre lui-même.

RÉSUMÉ

1. Au cours de la numération des microorganismes lipolytiques du beurre, selon la technique de RATH, on a observé que les résultats (nombre de lipolytiques/g de beurre) étaient souvent très différents pour deux dilutions successives ; le nombre de colonies lipolytiques était toujours plus élevé (2 à 10 fois) sur la boîte de milieu gélosé dans laquelle l'échantillon à analyser était le plus dilué.

2. On a montré que cette anomalie provenait d'une action antagoniste s'exerçant entre les microorganismes apportés dans le milieu gélosé.

Trois types de microorganismes ont été isolés :

Des « inhibiteurs » empêchant la mise en évidence des lipolytiques sur le milieu au beurre coloré ; des lipolytiques « sensibles » et des lipolytiques « résistants » aux « inhibiteurs ».

3. Des mélanges convenables de souches « inhibitrices », « résistantes » et « sensibles » ont permis de reproduire expérimentalement les anomalies observées lors de la numération des microorganismes lipolytiques du beurre.

SUMMARY

1. It has been observed that the plate count of lipolytic organisms in butter (number of lipolytic bacteria in 1 g of butter), using the RATH technique, differed according to the dilution at which the colony count was made ; the number of lipolytic colonies was always from 2 to 10 times higher on the agar plate in which the sample was the most diluted.

2. It has been shown that this discrepancy was due to an antagonistic action between the micro-organisms growing in the agar medium.

Three types of micro-organisms have been isolated : an « inhibitory » type which prevents visible lipolysis in the medium containing butterfat and two types of lipolytic bacteria, one « sensitive » and the other « resistant » to the « inhibitory » micro-organisms.

3. Suitable mixtures of « inhibitory », « resistant » and « sensitive » bacteria diluted and plated together in the butter medium gave similar results to those obtained with butter.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] S. RATH, *Milchwiss. Berichte*, 1961. Wolfpassing, 11 (2), 97-122.
- [2] E. BRANDL, E. SOBECK-SKAL et W. BINDER. *XVI^e Congrès International Laiterie*, 1962, Copenhague, C 399-402.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. MOCQUOT des conseils qu'il a bien voulu nous donner au cours de ce travail et lors de la rédaction du manuscrit.

RECHERCHES SUR LA CONDUCTIBILITÉ ÉLECTRIQUE DU LAIT DE CHÈVRE (1)

	par	
Nino PINO	et	Luigi CHIOFALO
Directeur		Assistant, chargé de Cours libre

Institut de Zootechnie générale
de la Faculté de Médecine vétérinaire
de l'Université de Messine

Le problème de la pureté naturelle des aliments d'origine animale n'a sans doute jamais été mis à si dure épreuve que de nos jours. L'inquiétude croissante suscitée par la découverte quoti-

(1) Etude faisant partie du groupe de travaux exécutés avec les fonds du Ministère de l'Hygiène et de la Santé, Direction Générale des Services Vétérinaires. Les auteurs expriment leur vive reconnaissance et leurs respectueux hommages à cet Organisme et au Directeur général des Services vétérinaires, le *Professeur Iginio Altara*.